

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Wiegandt H.* — In: *New Comprehensive Biochemistry* (eds. A. Neuberger, L. L. M. Van Deenen), v. 10, p. 199—260, Elsevier, Amsterdam, 1985.
2. *Sharom F. J., Grant C. W. M.* *Biochim. et. biophys. acta.*, v. 507, p. 280—293, 1978.
3. *Masserini M., Freire F.* *Biochemistry.*, v. 25, p. 1043—1049, 1986.
4. *Brady R. O., Fishman P. H.* *Adv. Enzymol.*, v. 50, p. 303—323, 1979.
5. *Venerando B., Tettamanti G., Cestaro B., Zambotti V.* *Biochim. et biophys. acta.*, v. 493, p. 461—472, 1975.
6. *Svennerholm L.* — In: *Handbook of Neurochemistry* (ed. A. Lajtha.), v. 111, p. 425—452, Plenum Press, N. Y. 1970.
7. *Venerando B., Fiorilli A., Masserini M., Giuliani A., Tettamanti G.* *Biochim. et. biophys. acta.*, v. 833, p. 82—92, 1985.
8. *Corti M., Degiorgio V., Ghidoni R., Sonnino S., Tettamanti G.* *Chem. Phys. Lipids.*, v. 26, p. 225—238, 1980.
9. *Ghidoni R., Sonnino S., Masserini M., Orlando P., Tettamanti G.* *J. Lipid Res.*, v. 22, p. 1286—1295, 1981.
10. *Svennerholm L.* *Biochim. et. biophys. acta.*, v. 24, p. 604—611, 1957.
11. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265—275, 1951.
12. *Tonasi M., Roda L. G., Austello C., D'Agno G., Venerando B., Ghidoni R., Sonnino S., Tettamanti G.* *Eur. J. Biochem.*, v. 111, p. 315—324, 1980.
13. *Corti M., Degiorgio V., Sonnino S., Ghidoni R., Masserini M., Tettamanti G.* *Chem. Phys. Lipids.*, v. 28, p. 197—214, 1981.
14. *Venerando B., Cestaro B., Fiorilli A., Ghidoni R., Preti A., Tettamanti G.* *Biochem. J.*, v. 203, p. 735—742, 1982.

Поступила 9. IX 1986

УДК 577.112

СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ГЛИКОПРОТЕИНЫ ГИПОТАЛАМУСА

СРАПИОНЯН Р. М.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Из гипоталамической области мозга получены в электрофоретически гомогенном виде четыре гликопротеина. Три из них (M_r 39, 24 и 20 кД) являются носителями ранее обнаруженных кардиотропных нейрогормонов «К», «Г», «С», образуя с ними соответственно нековалентно связанные комплексы. Исследование основных физико-химических свойств и некоторых структурно-функциональных особенностей указанных гликопротеинов позволяет заключить о существовании новых специфических для нервной ткани гликопротеинов, а использование метода радиационно-иммунологического анализа — однозначно утверждать о наличии в мозгу группы кардиотропных белок-гормональных комплексов.

В последнее десятилетие в нейробиологии наблюдается тенденция рассматривать сложные интегративные функцииНС с помощью системного подхода, включающего в себя основные положения молекулярной

биологии. В этой связи следует отметить, прежде всего, всестороннее изучение нейроспецифических белков и их функциональных превращений. Однако, несмотря на экспоненциальный рост числа работ, посвященных этим важнейшим биополимерам, в литературе отсутствуют конкретные и обоснованные положения об их физиологической роли в осуществлении специфических функций. Интегративные процессы в головном мозгу столь многогранны, что ограничить участие в них лишь уже известных нейроспецифических белков, по-видимому, невозможно. В этом отношении поиск неидентифицированных еще белков, связанных с определенными функциями и структурами мозга, весьма оправдан и является одной из актуальных задач нейрохимии.

Со времени выделения в 1964 г. Галояном [1] из гипоталамической области мозга специфического белка, обладающего коронарорасширяющей активностью, и, по мнению автора, являющегося носителем кардиотропных нейрогормонов «К» и «С» [2], прошло более 20 лет. За этот период обнаружены еще три белка, разработаны модифицированные схемы выделения и очистки последних, объединяющие уже ставшими традиционными методы гель-фильтрации через сефадексы, ИОХ на ДЭАЭ-ц, изоэлектрофокусирование в градиенте амфолинов и электрофореза в ПААГ, позволяющие получать дифференцированно в электрофоретически гомогенном виде четыре кардиоактивных белка [3, 4]. Три из них находятся в комплексе с нейрогормонами «К», «С», «Г», а четвертый—с еще неидентифицированным соединением (X). Соответственно, по принципу родства с нейрогормонами, эти белок-гормональные комплексы обозначены как «БНК», «БНС», «БНГ» и «БНХ». Их суммарный выход из ткани гипоталамуса составляет 12 мг/кг сырой массы. Наименьшим содержанием в гипоталамусе отличается «БНХ»—около 1,2 мг/кг, при этом оно варьирует в зависимости от условий экстракции. С понижением температуры выход «БНХ» резко уменьшается, с применением же неионных детергентов выход повышается. Это позволяет рассматривать «БНХ» как специфическую мембраносвязанную форму кардиоактивных белков.

Связь между нейрогормонами и белками достаточно слаба и, по-видимому, имеет гидрофобный характер; она разрушается при кислых значениях рН (ниже 3) и температуре, равной -20° и $+65^{\circ}$. Подобная связь при физиологических значениях рН и обеспечивает структурное интегрирование. Диссоциация же комплекса после его выхода в кровь дает возможность целенаправленного транспорта гормонов в различные висцеральные органы. В литературе описаны аналогичные примеры, демонстративными из которых являются нейрофизины. Это семья родственных белков, основная функция которых—транспортная [5, 6]. Нейрофизины являются носителями нейрогипофизарных гормонов—вазопрессина и окситоцина, с которыми они находятся в нековалентно связанном комплексе. Широко распространено мнение о том, что такое связывание является результатом компарментализации во время биосинтеза нейрогипофизарных гормонов и нейрофизинов [7].

Коронароактивные белок-гормональные комплексы были выделены нами из гипоталамусов ряда животных (крыса, кролик, кошка, свинья, овца, крупный рогатый скот) [8]. Лучшей экспериментальной моделью среди таких комплексов являлись препараты, полученные из гипоталамусов крыс, их коронарорасширяющая эффективность гораздо выше по сравнению с другими. Однако ввиду их малого содержания и с целью получения в препаративных количествах в работе использовали гипоталамус крупного рогатого скота.

Исследование ряда физико-химических свойств выделенных из комплекса белков, лишенных коронароактивности (так называемых апоформ), позволяет отнести их к группе слабокислых с величинами M_r , равными для «БНС», «БНГ» и «БНК», по данным электрофореза в ПААГ с ДДС-Na—20, 24 и 39 кД соответственно. Их изоточки также находились в узком диапазоне рН, присущем слабокислым соединениям (5,9—6,3). Данные об аминокислотном составе этих белков подтвердили их слабокислый характер: количество в них основных и кислых аминокислотных остатков оказалось примерно одинаковым. Из полярных аминокислот во всех исследованных белках доминировали остатки серина, глицина, аланина, глутаминовой кислоты, в сумме составлявшие 43—50%. Обращает на себя внимание отсутствие в «БНС» и незначительное содержание в «БНК» ароматических аминокислот. Величины M_r , рассчитанные по данным аминокислотного анализа, оказались, в основном, ниже по сравнению с данными электрофореза в ПААГ с ДДС-Na. Такую разноречивость мы объясняли частично наличием небелковых компонентов в молекулах исследуемых соединений. Окрашивание электрофореграмм этих белков после электрофореза в ПААГ специфическими реагентами, обнаруживающими нуклеотиды, липиды и углеводы, так же, как и биохимические определения, выявили наличие лишь углеводных компонентов.

В дальнейших исследованиях с помощью современного арсенала приемов для расщепления гликозидных связей, в частности метанолиза и последующего анализа триметилсилильных производных, была сделана попытка расшифровать моносакхаридный состав углеводного компонента. При этом были обнаружены из аминос сахаров—N-ацетилглюкозамин, N-ацетилгалактозамин, из нейтральных сахаров—манноза и галактоза, была также найдена сиаловая кислота. В общем, входящие в кардиоактивные комплексы белки можно отнести к типу N-гликозидносвязанных, маннозосодержащих гликопротеинов.

Способствие аминокислотного состава и наличие углеводного компонента обусловили нетипичный для белков УФ-спектр. Особенно это касается «БНС», характеризующегося слабым поглощением и не обнаруживающего максимума в области 270—280 нм. Спектры «БНГ» и «БНК» характеризовались максимумом поглощения при 270 нм, но сравнивая величины их оптической плотности и величины M_r , можно допустить, что в «БНК» триптофановых остатков содержится на моль вдвое больше, чем в «БНГ».

Итак, молекулы этих белков различаются по некоторым физическим

свойствам, что обусловлено различиями в их структурной организации. В частности, конформация «БНС» резко отличается от конформации других двух белков. Его спектр КД характерен для белковой молекулы с высоким содержанием неупорядоченной структуры, незначительным содержанием β -структуры и почти полным отсутствием α -спиральности. Содержание последней в «БНГ» и «БНК» примерно одинаково, однако доля неупорядоченного клубка выше в «БНК», что свидетельствует о более плотной упаковке ее молекулы.

Получение высокоспецифических (процент перекрестных реакций не превышает 0,1) антисывороток к бычьим «БНС», «БНГ» и «БНК» позволило альтернативно объяснить существование семьи родственных коронароактивных белок-гормональных комплексов. Помимо высокой специфичности эти антисыворотки характеризовались достаточной чувствительностью и позволяли уверенно определить до одного нг белка в пробе. Пригодность иммунных сывороток для радиоиммунологического определения содержания оценивалась по их способности конкурировать с соответствующим ^{125}I -белком за связывание со специфической антисывороткой [9]. Используя реакцию связывания комплемента, удалось установить специфичность кардиоактивных белок-гормональных комплексов для нервной ткани, поскольку их содержание в ней, по крайней мере, в тысячу раз превышает содержание в любом другом органе. Однако в разных отделах головного мозга они распределены неравномерно: высоким содержанием (мкг/г сырой массы) «БНС» и «БНГ», кроме гипоталамуса (1,5 и 1,4), отличаются мозжечок и кора больших полушарий мозга (0,8 и 1,0 соответственно). «БНК» же распределяется более равномерно; это не объясняется присутствием крови, так как, во-первых, у перфузированных животных выявлена аналогичная картина, а во-вторых, при пересчете на один мг белка содержание «БНК» в сыворотке крови существенно ниже, чем в мозгу.

Сопоставление величин иммунореактивности кардиоактивных комплексов в висцеральных органах свидетельствует об их выраженной органоспецифичности. Так, «БНС» в значительных количествах (в нг/г сырой массы) обнаруживается в сердечной (0,40) и скелетной (0,41) мышцах и надпочечниках (0,43), «БНГ»—в надпочечниках (0,38) и в панкреатической железе (0,30), а «БНК»—в печени (0,80). В остальных висцеральных органах (селезенке, легких, почках) активность была очень низкой, либо отсутствовала. Достаточное количество (в нг/мл) этих биополимеров обнаруживалось в сыворотке крови: «БНГ»—25, «БНК»—13, «БНС»—10.

При интерпретации обнаружения иммунореактивных кардиоактивных комплексов гипоталамуса в нервных структурах мы допускаем несколько предположений. С одной стороны, возможно наличие в последних веществ, близких к обнаруженным в нервной ткани. С другой стороны, не исключена возможность наличия в этих органах нейронов типа ARUD, способных к синтезу соединений, идентичных белок-гормональным комплексам нервного происхождения.

Можно допустить, что, подобно белку S-100, обнаруженному в эпифизе, аденогипофизе и надпочечниках [10], нейроспецифической энолазе, выделенной из островковых клеток поджелудочной железы, С-клеток тиреоидной железы и хромоаффинных клеток надпочечников [11], или нейрофизинам, обнаруженным в эпифизе [12], кардиоактивные гликопротеины являются скорее маркерами определенного типа клеток нейроэктодермального происхождения.

И наконец, не исключается возможность выхода этих комплексов, аналогично нейрофизинам, в общую циркуляцию при условиях, стимулирующих выброс кардиотропных нейрогормонов «К», «С» и «Г». В пользу этого предположения свидетельствуют данные о наличии кардиоактивных белок-гормональных комплексов в нейросекреторных гранулах гипоталамо-нейрогипофизарной системы различных животных [13], весьма близких к «БНС», «БНГ» и «БНК», выделенных из целых гипоталамусов тех же видов.

Сравнение данных, полученных при изучении субклеточного распределения белок-гормональных комплексов в гипоталамусе, показало, что, за исключением синапсомной, в остальных исследованных субфракциях (ядерной, миелиновой, митохондриальной) они не были обнаружены [14].

Белковый спектр синапсомом отличается сложной гетерогенностью; в них было обнаружено более 20 белков, в том числе и гликопротеины с величиной M_r от 16 до 125 кД. Среди них выявлены нейроспецифические белки S-100 и 14-3-2 [15, 16], ряд гормонов (люлиберин, тиреолиберин, норadreналин) [17]. В последние годы появилось множество сообщений, в которых были сделаны попытки связать преимущественную локализацию нейроспецифических белков в синапсомоме с участием этих белков в специфических функциях нервной ткани.

О функциях кардиоактивных гликопротеинов можно высказать следующее: прежде всего, они являются интрацеллюлярными транспортными молекулами. Это функциональное их значение давно уже установлено [1, 2] и доказана идентичность выделенных из комплексов низкомолекулярных кардиоактивных соединений по многим параметрам с кардиотропными нейрогормонами «К», «С» и «Г» [18]. Кроме того, мы попытались также связать преимущественную локализацию этих гликопротеинов в синапсомной фракции с процессами, происходящими в нервной ткани, в частности, на основании данных об участии выделенных из этих комплексов кардиоактивных нейрогормонов в пресинаптической регуляции высвобождения катехоламинов в гипоталамусе. И наконец, заслуживает особого внимания для выяснения функциональной роли исследуемых гликопротеинов обнаружение факта их существования в виде препрогормональной формы кардиотропных нейрогормонов [19, 20]. Доказательством явилось выделение в результате протеолиза специфических гликопротеинов шести кардиоактивных триптических доменов, явившихся, в свою очередь, прогормональными формами кардиотропных нейрогормонов «К», «С» и «Г». Обнаруженные домены являются гликопептидами с различной величиной M_r (от 6 до 10 кД); основные физико-химические,

биохимические и биологические свойства которых имели большое сходство с указанными нейрогормонами. Систематизация экспериментальных фактов позволила однозначно установить, что указанные гликопептиды являются предшественниками, кроме коронароактивных, ряда других биоактивных соединений (регулирующих внутриклеточный уровень содержания циклических нуклеотидов, участвующих в процессе гликолиза, гликогенолиза и пресинаптической регуляции высвобождения катехоламинов в гипоталамусе).

Поиск альтернативного объяснения биохимических превращений, предшествующих расслаблению гладкой мышцы коронарных сосудов под действием кардиоактивных гликопептидов, начинали с изучения активности фосфодиэстеразы сАМР мозга, исходя из ингибирующей активности этого фермента действия как ряда сердечных лекарственных препаратов, так и кардиотропного нейрогормона «С» [21]. Из триптических доменов специфических гликопротеинов, как оказалось, три ингибировали активность ФДЭ сАМР в достаточной степени (от 40 до 57%), остальные кардиоактивные домены никакого действия не оказывали [22]. Итак, под действием таких гликопептидов должно происходить накопление сАМР, этого уникального посредника, принимающего участие во многих биохимических превращениях, в том числе и в процессе гликогенолиза, в котором он участвует в активации гликоген-фосфорилазы и последующего перехода фосфорилазы *a* в *b*-форму. Аналогично действует и нейрогормон «С» [23]. Это послужило предпосылкой для проведения исследований по изучению изменений активности фосфорилазы под действием кардиоактивных доменов. Сопоставление полученных данных позволило заключить, что, в общем, они повышают активность фермента во всех органах, но особенно существенно в мозгу, сердечной и скелетной мышцах. При этом нельзя исключить органоспецифическое действие каждого из них. Триптический фрагмент «БНС», обозначенный как ТфБНС, интенсивно активирует сердечную фосфорилазу (на 170%), ТфБНГ—фосфорилазу скелетной мышцы (на 150%), а ТфБНК—мозговую фосфорилазу (на 100%). Поскольку из изученных форм фосфорилазы, как было установлено, повышалась активность фосфорилазы *a*, то можно допустить, что имело место классическое фосфорилирование с переходом формы *a* в *b* [22]. Можно полагать, что в критических ситуациях, вызываемых либо чрезмерными энергетическими затратами нервной ткани, либо, наоборот, недостаточным запасом в ней энергетических средств (ограниченного притока глюкозы или кислорода), они могут способствовать активации этого перехода.

Известно образование многих нейропептидов в результате ограниченного протеолиза физиологически неактивного предшественника [24]. Многочисленные примеры этого целесообразного принципа экономии в природе может представить ЦНС высших животных. Наиболее уникальным среди этих примеров является образование из проопиомеланокортина целой группы важнейших нейроактивных пептидов с различными физиологическими эффектами [25].

Исходя из всего сказанного, можно заключить, что кардиоактивные гликопротеины, безусловно, могут быть включены в особый класс предшественников. Класс этот, по общепринятому мнению, объединяет молекулы, «основной ролью которых является осуществление и регуляция функционального взаимодействия разных уровней системной и биологической организации» [26].

SPECIFIC PROTEINS OF HYPOTHALAMUS

SRAPIONIAN R. M.

Institute of Biochemistry, Arm. SSR Academy of Sciences, Yerevan

Four glycoproteins have been isolated in electrophoretically homogeneous state from bovine hypothalamus: three of them with M_r 39,24 and 20 D turned to be the carriers of the earlier discovered cardiotropic, neurohormones „K“, „G“ and „C“ forming with the latter non-covalent complexes. Study of physico-chemical properties and structure-function relationships as well as RIA analysis of these glycoproteins makes it possible to claim existence of a new class of brain-specific glycoproteins—a family of cardioactive protein-hormonal complexes.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Галоян А. А., Докл. АН АрмССР, т. 38, с. 305—307, 1964.
2. Галоян А. А., Срапионян Р. М. Биол. журн. Армении, т. 20, с. 3—8, 1967.
3. Срапионян Р. М., Саакян С. А., Галоян А. А. Вопр. биохимии мозга, т. 11, с. 97—103, Ереван, АрмССР, 1976.
4. Срапионян Р. М., Саакян С. А., Саакян Д. М., Галоян А. А. Вопр. биохимии мозга, т. 13, с. 67—78, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1978.
5. Alvarez-Buylla R., Livett B., Utenthal L., Hope D. B. Z. Zellforsch, v. 137, p. 435—450, 1973.
6. Sinding C., Robinson A. Metabolism, v. 26, p. 1355—1370, 1977.
7. Carlson J. D., Breslow E. Biochemistry, v. 20, p. 5062—5072, 1981.
8. Galoyan A., Srapiotian R. Neurochem. Res., v. 8, p. 1511—1532, 1983.
9. Срапионян Р. М., Абелян Ж. Г., Галоян А. А. Вопр. мед. химии, т. 31, с. 20—24, 1985.
10. Rende M., Zucco M., Cocchio D., Michetti F. —In: 8-th Meet. Intern. Soc. Neurochem., p. 70, Nottingham, Abstracts, 1981.
11. Schmechel D. E. Nature, v. 276, p. 834—836, 1978.
12. Vinores S. A., Marangos P. J. J. Neurochem., v. 39, p. 1748—1750, 1982.
13. Galoyan A., Srapiotian R., Sahakian F. Reprint form Neurosecretion Neuroendocrine Activity Evolution and Function, p. 190—193, Springer—Verlag, Berlin, 1987.
14. Srapiotian R., Sahakian F., Galoyan A. Neurochem. Res., v. 6, p. 1259—1307, 1981.
15. Haglid K. G., Hamberger A., Hanson H. A., Hyden H., Person L. Nature, v. 252, p. 532—534, 1974.
16. Grasso A. Exhptl. Brain Res., v. 23, suppl. 79, 1975.
17. Parker C. R. Endocrinology, v. 102, p. 1167—1171, 1978.
18. Галоян А. А., Срапионян Р. М., Алексоян Р. А. Докл. АН АрмССР, т. 51, с. 125—128, 1970.

19. Срапионян Р. М., Саакян С. А., Галоян А. А. Нейрохимия, т. 2, с. 263—271, 1983.
20. Саакян С. А., Срапионян Р. М., Спакян Д. М., Попова Т. В., Галоян А. А. Нейрохимия, т. 3, с. 12—20, 1984.
21. Галоян А. А. Вopr. биохимии мозга, т. 13, с. 9—38, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1978.
22. Срапионян Р. М., Саакян С. А., Абелян Ж. Г., Галоян А. А. Нейрохимия, т. 1, с. 36—42, 1982.
23. Галоян А. А., Абелян Ж. Г., Алексанян С. С., Бархударян Н. А. Докл. АН АрмССР, т. 60, с. 117—120, 1975.
24. Seidah N. G., Chretien M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci., v. 78, p. 4236—4240, 1981.
25. Seidah N. G., Rochemont J., Hamelin J., Lis M., Chretien M. J. Biol. Chem., v. 256, p. 7977—7984, 1981.
26. Шерстнев В. В., Полтавев А. Б., Долнов О. Н. Успехи физиол. наук, т. 3, с. 66—86, 1979.

Поступила 10. IX 1985

УДК 612.82+577.152.344

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ВЕЩЕСТВА P И АНГИОТЕНЗИНПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА

СИМС В. Э., ХЕДЕР Г., ЭМЕ П.

Институт по исследованию лекарственных препаратов АН ГДР, Берлин

В течение последних лет появилось много данных о взаимодействиях вещества P и ангиотензинпревращающего фермента (АТФФ) (КФ 3.4.15.1): ингибирование АТФФ с помощью вещества P, деградация вещества P посредством АТФФ и некоторые дополнительные результаты экспериментов *in vivo*. АТФФ—относительно неспецифическая дипептилдипептидгидролаза, отщепляющая от пептидной цепи C-концевой дипептид. Наиболее важными субстратами для нее являются вазоактивные пептиды—ангиотензин I и брадикинин.

Реакции между веществом P и АТФФ несколько противоречат существующим концепциям о строении каталитического центра АТФФ. Согласно Cushman, Ondetti и Petrillo [1—3], ингибиторы АТФФ должны соответствовать следующим структурным критериям: содержать Zn^{2+} -связывающую группу; два гидрофобных участка, реагирующих с соответствующими гидрофобными карманами фермента (S_1 и S_2); водородную связь между двумя гидрофобными участками; C-концевую отрицательно заряженную группу (COO^-), взаимодействующую с катионным остатком аргинина фермента; расстояние между Zn^{2+} -связывающей группой и $COOH$ -группой должно соответствовать длине дипептидной цепочки.